

## マガキ血球の異物接着機構におけるインテグリンの機能に関する研究

著者	寺原 和孝
号	732
発行年	2002
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/16833">http://hdl.handle.net/10097/16833</a>

氏 名(本籍)	寺 <sup>てら</sup> 原 <sup>はら</sup> 和 <sup>かず</sup> 孝 <sup>たか</sup>
学 位 の 種 類	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 7 3 2 号
学位授与年月日	平 成 15 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 専 攻	東北大学大学院農学研究科資源生物科学専攻 (博士課程)
学位論文題目	マガキ血球の異物接着機構におけるインテグリンの機能 に関する研究
論文審査委員	(主 査) 教 授 森 勝 義 (副 査) 教 授 谷 口 順 彦 教 授 佐 藤 實

# 論文内容要旨

## 序論

水産増養殖対象生物である海産二枚貝類のマガキ *Crassostrea gigas* は、環境要因が大きく変動する沿岸域を生活の場としているため、様々な環境ストレスに対抗して恒常性を維持し、健全な生活を営むためには総合的な体を守るしくみ、すなわち生体防御機構の果たす役割は大きいものと考えられる。増養殖システムの高度化・安定化のために、優良な母貝や種苗を選抜したり、また、個体の生育に悪影響をおよぼす生産海域の環境の変化を予測することによって事前に大量斃死を防ぐといったことが挙げられるであろう。そのためには、生産現場における増養殖対象生物の生理状態を迅速に把握することが必要である。しかし、現時点では、個体の生理状態を適切に評価する基準はない。そこで本研究では、生体防御能が個体の生理状態の評価に役立つのではないかと考え、生体防御機構を明らかにすることを試みた。

脊椎動物にみられる適応免疫が存在しない二枚貝類の生体防御は、特に強い食食能を持つ血球の機能に依存した自然免疫が中心的役割を担うと考えられる。血球が粒子を食食するためには、血球がその粒子に対して自己か非自己か（すなわち、異物かどうか）を認識することが不可欠である。そして、それに先立って血球は標的粒子と接着することが必要である。しかしながら、血球が示す「接着」の重要性については近年に至るまで現象の観察結果を記録することとどまり、接着機構に対する生化学・分子生物学的解析は行われていなかった。そこで本研究では、血球の接着反応を司る分子として想定されるインテグリンの機能に着目し、生化学・分子生物学的解析を行うことによってマガキ血球の異物接着機構について明らかにすることを目的とした。

さらに本研究は、インテグリンによって調節を受けた後の血球の動態についても解析した。その過程で、インテグリンによって調節を受けた血球に生理的な細胞死、すなわちアポトーシスが誘導されることを見出した。哺乳類を中心とする従来の研究では、インテグリンの機能や細胞のアポトーシス誘導機構についてそれぞれ独立して研究されてきたのに対し、本研究はそれらを有機的に関連付けることに視点を置き、血球の活性化から終末に至るまでの過程を形態学的観察および生化学的手法を主体とした解析を行うことで、生体内における血球の存在意義について考察した。

## 第1章 マガキ血球の接着・伸展反応の解析

マガキ血球の示す接着・伸展反応へのインテグリンの関与を確かめるために、マガキ血リンパ血漿、インテグリンのリガンドであり細胞接着活性を有することが知られているフィブロネ

クチン (FN)、そしてインテグリンとの結合部位として知られているアルギニン-グリシン-アスパラギン酸 (RGD) 配列を含む FN フラグメントを固相化した、それぞれの基質に対する血球の伸展能を解析した。その結果、二価陽イオンの存在下では、血リンパ血漿や FN、そして FN フラグメント基質に対して血球の伸展能は大きく亢進した (Fig. 1)。しかし、二価陽イオンが存在しない条件下では、FN 基質に対する伸展能の亢進は認められず (Fig. 1)、また、各基質にみられた伸展血球の形態は、針状仮足の形成がほとんど認められず、球形に近い形態を示した (Fig. 2)。

さらに、血球の接着・伸展反応について、顆粒球と無顆粒球の2つの細胞集団について解析した結果、両者に反応性の違いが認められ、血リンパ血漿や FN が存在しない条件下において顆粒球は無顆粒球よりも高い伸展活性を示した (Fig. 3)。

以上のことから、マガキ血球の接着・伸展反応は FN によって二価陽イオン依存的に亢進され、その反応においてインテグリン様分子とリガンドとの相互作用が関与することが推察された。そして血リンパ血漿にも機能的に類似したリガンドが存在する可能性が示唆された。さらに、顆粒球はリガンドの存在しない条件下でも高い伸展活性を示したことから、自身でリガンドを産生・分泌する可能性が示された。

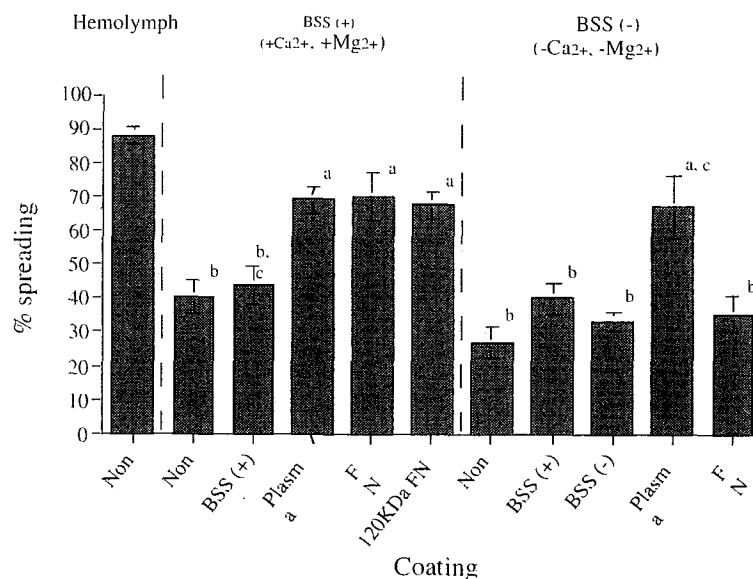


Fig 1 Ratio of the spreading hemocytes attaching onto immobilized each substrate of glass slides. The hemocytes in hemolymph, the BSS (+) suspended-hemocytes, and the BSS (-) suspended-hemocytes were mounted onto each well and were placed for 1 h. Each value shows the mean  $\pm$  s.e.m. of five animals. Different letters denote significant differences ( $p < 0.05$ ). The data of the intact hemocytes was excluded from the statistical analysis.

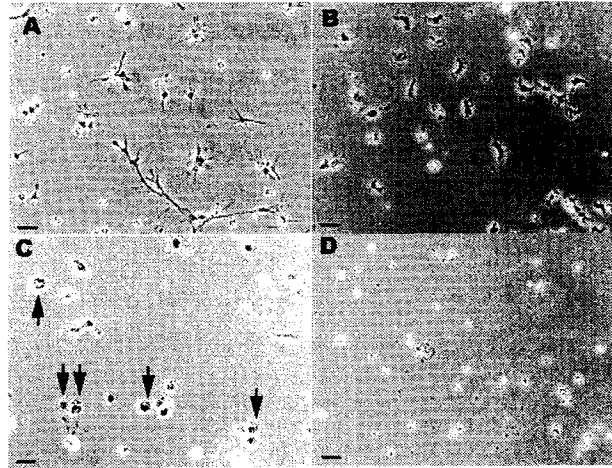


Fig. 2 Phase-contrast micrographs of the *C. gigas* hemocytes. A, BSS (+) suspension-hemocytes on the *C. gigas* plasma-immobilized glass slide; B, BSS (+) suspension-hemocytes on the FN-immobilized glass slide; C, BSS (-) suspension-hemocytes on the *C. gigas* plasma-immobilized glass slide; and D, BSS (+) suspension-hemocytes on the noncoated glass slide. Each of the hemocytes was placed on each well for 1 h. Arrows indicate spherical-shaped hemocytes. Scale bar, 20  $\mu$ m.

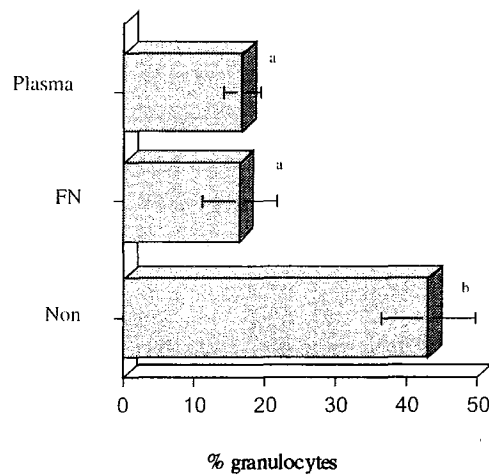


Fig. 3 Ratios of spreading granulocytes in attaching hemocytes onto immobilized each substrate of glass slides. The hemocytes suspended in BSS (+) were mounted onto the plasma- (Plasma), FN- (FN), and non- (Non) immobilized glass slide surfaces for 1 h at 20°C. Each value shows the means  $\pm$  s.e.m. of four oysters. Different letters indicates significant differences ( $p < 0.05$ ).

## 第2章 マガキ血球の生存性に関するインテグリン様分子の機能

インテグリン様分子とリガンドの相互作用が関与することが推測されたマガキ血球の接着反応において RGD 認識機構が関与するのか検討するために、懸濁状態のマガキ血球にあらかじめ RGD ペプチドを作用させ、固相化した FN 基質に対する接着阻害実験を行った。その結果、RGD ペプチドで処理した血球では伸展能の低下が認められるとともに (Fig. 4)、生存率も大きく低下した (Fig. 5)。

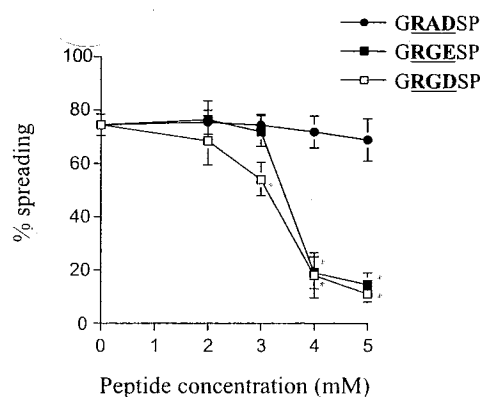


Fig. 4 Effects of the three synthetic peptides (GRGDSP, GRGESP, or GRADSP) on *C. gigas* hemocyte spreading. After treatment with each concentration of the peptides, hemocytes were placed on human FN-immobilized glass surfaces for 1 h at 20°C. Each value shows the mean  $\pm$  s.e.m. of five oysters. Asterisks (\*;  $p < 0.025$ ) indicate significant differences from the control (0 mM).

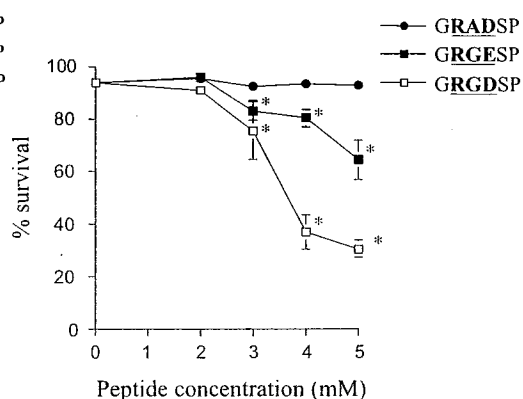


Fig. 5 Effects of the three synthetic peptides (GRGDSP, GRGESP, or GRADSP) on *C. gigas* hemocyte survival. After treatment with each concentration of the peptides, hemocytes were placed on human FN-immobilized glass surfaces for 1 h at 20°C. Each value shows the mean  $\pm$  s.e.m. of five oysters. Asterisks (\*;  $p < 0.025$ ) indicate significant differences from the control (0 mM).

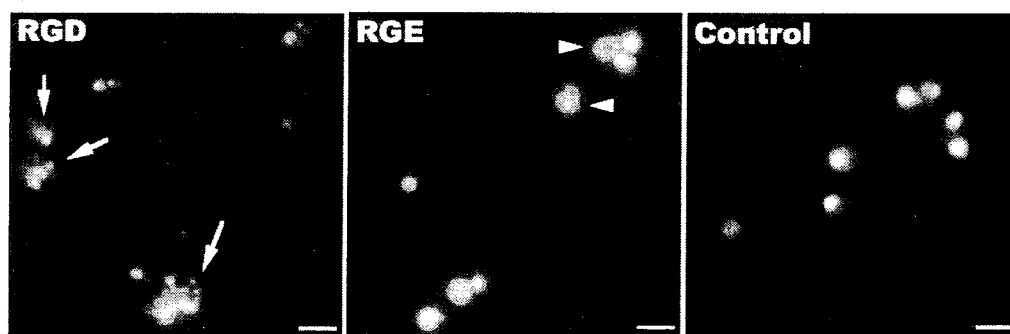


Fig. 6 Fluorescence micrographs of the *C. gigas* hemocytes stained with Hoechst 33258. The hemocytes were treated with 4 mM RGD, RGE peptides, or only BSS (Control) for 24 h. Arrows indicate apoptotic hemocytes and arrowheads indicate membrane-destructed hemocytes. The scale bars indicate 10  $\mu$ m.

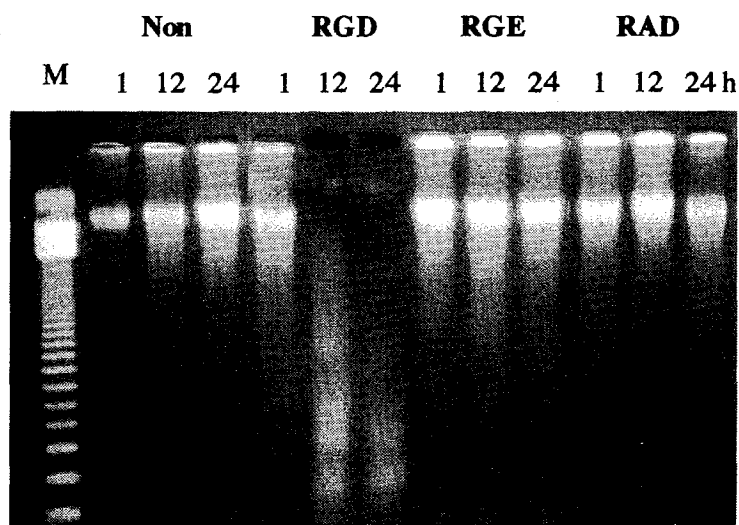


Fig. 7 Electrophoretic analysis of DNA extracted from suspended *C. gigas* hemocytes. The hemocytes were treated with no peptides (Non), 4 mM GRGDSP (RGD), 4 mM GRGESP (RGE), or 4 mM GRADSP (RAD) for 1, 12, and 24 h at 20°C. M is a 123 bp ladder marker.

ここでみられた死の形態をヘキスト染色と DNA 断片化の検出によって解析した結果、アポトーシスであることが明らかとなった (Figs. 6, 7)。

RGD ペプチドによるアポトーシス誘導効果は、懸濁 (未接着) 状態の血球に対してだけではなく、FN 基質に接着したことによってインテグリン様分子が活性化したと考えられる血球に対しても認められた。

さらに、固相化した FN あるいは血リンパ血漿基質に対して接着・伸展した血球は、RGD ペプチドを作用させなくても、反応を開始してから 1 日後に生存率が有意に低下することが認められ (Fig. 8)、その細胞死の形態は形態観察 (Fig. 9) と DNA 断片化の判定 (Fig. 10) から、アポトーシスであることが明らかとなった。しかし、このアポトーシスの誘導は溶液状態の血リンパ血漿によってその進行が遅れることから (Fig. 8)、血リンパ血漿中にアポトーシスの進行を遅らせる作用を示す因子の存在が示唆された。

以上の結果から、RGD 配列を介した認識機構はマガキ血球に対してアポトーシスを誘導することが明らかとなった。また、マガキ血球におけるインテグリン様分子の活性化はアポトーシス誘導の引き金になることが示唆された。

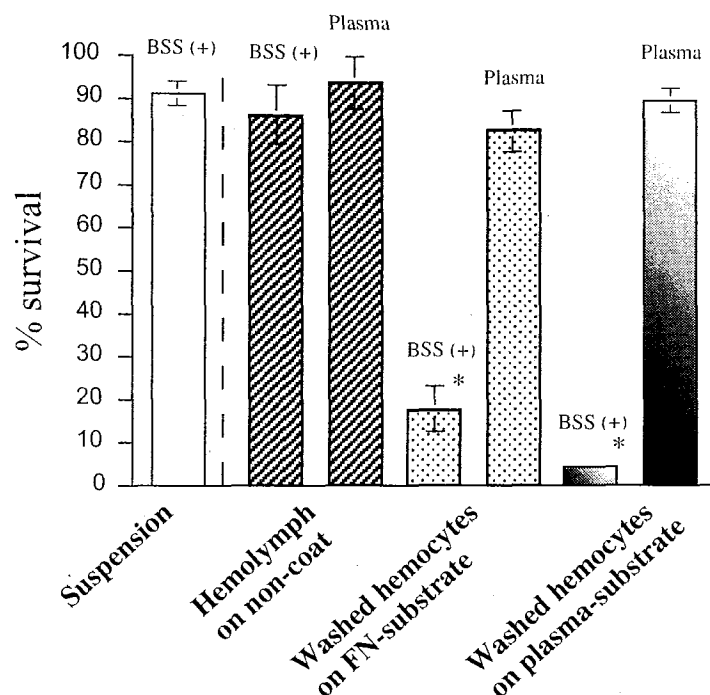


Fig. 8 Viability of the *C. gigas* hemocytes suspended in BSS (+) and attached on each surface with BSS (+) or plasma. The hemocytes were incubated for 24 h at 20°C. Percentage of survival was assessed by dye exclusion test with 0.4% tripan blue. Each value shows the mean  $\pm$  s.e.m. of three oysters. Asterisks (\*;  $p < 0.05$ ) indicate significant differences from the other values. Statistical analysis was performed by Tukey's multiple comparison test.

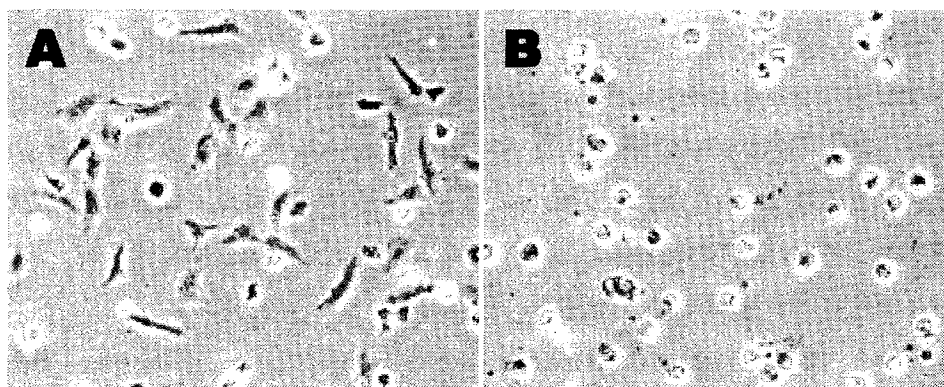


Fig. 9 Phase-contrast micrographs of the trypan blue-stained *C. gigas* hemocytes attached to *C. gigas* plasma-immobilized substrates. The hemocytes attached to the substrates were post-incubated with the plasma (A) or BSS (+) (B) for 24 h at 20°C.



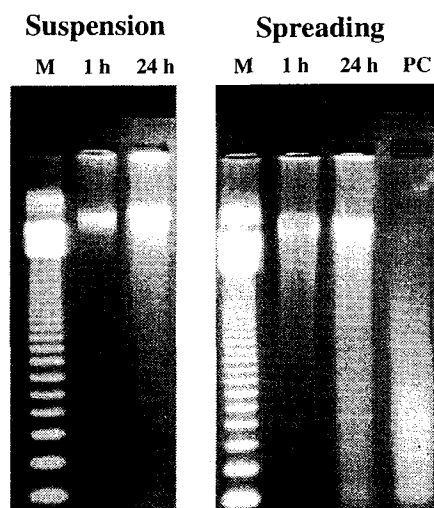


Fig. 10 Electrophoretic analysis of DNA extracted from the suspended and spreading *C. gigas* hemocytes. DNAs were extracted from each hemocytes after 1- and 24-h incubations. PC shows the DNA extracted from the 4 mM GRGDSP-treated hemocytes after 24-h incubation. M is a 123 bp ladder marker.

### 第3章 マガキ血球におけるインテグリン遺伝子の発現

第1章、第2章の結果から、マガキ血球にインテグリン（様分子）が存在することが強く示唆された。そこで、マガキ血球におけるインテグリンの存在を遺伝子のレベルで明らかにするためにインテグリンβ鎖のクローニングを行った。これまでに知られている無脊椎動物のインテグリンβ鎖の配列をもとにして degenerate プライマーを設計し、これを用いて degenerate PCR を行った結果、インテグリンβ鎖との相同性が認められる配列が得られた。この配列をもとにして設計されたプライマーを用いて、RT-PCR、5'・3' RACE 法を行い、ORF の全塩基配列を明らかにした。この ORF は 799 アミノ酸をコードする 2400 bp の塩基配列から成り立っていた (Fig. 11)。また、マガキインテグリンβ鎖 ( $\beta_{CGH}$ ) の成熟タンパク分子量は 106842.94 Da と推定された。構造解析の結果、 $\beta_{CGH}$  は細胞外領域、膜貫通領域、細胞質内領域の3つの領域に区分され、リガンドとの結合やインテグリンの活性化に関与するとされる構造、モチーフが保存されていた。

	tcaccaacaaaagtgttcttattatggttattggttgcgttaattgtatttttattgattgtacagttgctgggagaaaga	-1
1	ATGGTATCGACGGTTTGGTTTATGTTTACAACAATTTCTGTTCCTAAATCCTATCGGGAAATGAGTGCACAAAGATTACGATCT	90
	<b>M V S T V T F L C F T I F C S L N F I G K L S A Q D L R S</b>	
31	GATACTTTGACGCTACACAGGAAACCGTGCCTGAAGGAAAGACCAACATGTGGGGAGTGATAGCAATATCTACCCGTGTGGCA	180
	<b>D T L T F T Q N N P C L K E K T T T C G N C I A I S T L C A</b>	
61	TTCTGTACCGACGCTGAGTATGACGCCAACAATTATCCAGGTGTGACCTACTGACCACTCATCAGAACTCATCAACAACAGCCAGG	270
	<b>F C T D A N Y D A N N Y P R C D L L T T T N Q K L I N N K P R</b>	
91	TGTAAAGCATCGTCAATCCGTCATCAACCCCTCGTAAAGAGCAGGGATGACAGATTGATTGATGGCGATAGGGACAGATATGCCGTACAG	360
	<b>C K D I V N P S S T L V K S R D D R L I D G D R D R Y A V Q</b>	
121	ATCAGACCCAGCAATCGACCTGGAGTACGTCCAAATGACCCCTCAGACATTTATCTGACGTTCCGATTGGCTGAGAACTATCCAGTC	450
	<b>I R P Q Q I D L N L R P N D P Q T F N L T F R L A N N Y F Y</b>	
151	GACCTCTACTACCTTATGGACCTCTCAAACCTCATGGCAGACGACAAAGAAACTGGCCAGCCTTGGAGTCAAGATAGCTGAAGACATG	540
	<b>D L Y Y L M D L S S M A D D K N K L A S L G V N I A E D M</b>	
181	AGCACCATCACTAAGAACTTCAAGCTGGGTTTGGTTCCTTGTGGACAGGTTGTCATGCCCTACGTCAGTACAGCCCTTAATAAAATT	630
	<b>S T I T K N E F K L G E G S E V D K V V M P Y V S T A P K I</b>	
211	AACAGTCTTGTCCAGGATGTGAGAGGCTTATGGATTGAGAAAGCTTCCACCCATTGGACCCAAATGCTACACTGTTACAGGACAAAGTC	720
	<b>N S P C C A G T C C K A Y I G F R N V N F L D F N A T L F R D K V</b>	
241	AATGTCAGCACTGTCTGCTGTAACCTGTGCTCGGAGGGTGGVTTTCGACGCCATCATGCGAGCCATAGCTTGTGAGACAGATGTTGGG	810
	<b>H A A K V S G N L D A P H G G F D A I M Q A I A C N T E I G</b>	
271	TGGAGGAAACCGATCCAGAAATGTTGCTGCTCCACAGACGCTGGGATTTCAATACGCTGGGACGGAGAACTGGGAGGCATCATTCAA	900
	<b>W R M R S R R M L L F S T D A G F R Y A G D G N L G G I I Q</b>	
301	CCCAATGTGGAAGCTGTCTATCTGCTGACGGAATGTACACAGAAAGTTCTAATCAGGACTACCCCTCTATTAGTCAAGTCGCGGTG	990
	<b>P E D G E C E L S P D G M Y T E S S S N Q D Y P S I S Q V A V</b>	
331	AAAGCCAGGAAAGAAATGTCAACATCATTTTCGCCCTCACCAGCATCAAAGAACATTTATGATCAGCTCAAGCCAATCATTTGCGGGA	1080
	<b>K A K N N I I F A V T N D Q K N I Y D Q L K P I A G</b>	
361	TCGGAAACAGGAGTTTGGCCCTCAGACTCACAGAAGCTGTCAAGCTAGTCAGAGACAACTACTTGGCCATCATCAAAAGTAGAAATG	1170
	<b>S E T G V L A S D S Q N V V K L V R D N Y L A I T S K V M</b>	
391	ATTGTGAAAGCTCAGACAAATTTGGAGGTGAATTCAGGACAAATGTAAAGGAACTGAAGAGAAAGAGACAAAGTGTGAGAACTTG	1260
	<b>I V N N S D N L N V K F R T K C K S T N N K N T N K C N L</b>	
421	GCCATTTGAGGATCTGTGGATTTCAGTGTGACAGTGAAGTGAAGAGCTGCCGCCCAAGGTGAAGAGGAGAGGACCCCTCAGGATCAAA	1350
	<b>A I G G S V D F S V T V N V K S C P P K G N N R T L R I K</b>	
451	CCAGTCCGACTGTATGATGATTGACTGTCAAACCTGAAGCTCATGTGTGCTGACTGCGAGTCCCAAGCAATGGAAGACAAACAAG	1440
	<b>P V G L Y D D L T V K L K L M C Q C D C N S P K Q M N D M K</b>	
481	AACACAGAAATGTAATGGAACCGGACGTACGTGTGGAATGTGCTGTGTAACGAGCCGTACTTTGGAGACTATTGTGACTGTGAC	1530
	<b>A A C C A G A A T G T A A T G G A A C G G A C G T A C G T G T G G A A T G T G C T G T A A C G A G C C T A C T T T G G A G A C T A T T G T G A C</b>	
511	AAAGGACCCAGGACCATGCTGACAGGAGTGTGATCCAGACAAAGACACGACCATCATCTGTAAACGCCCGGGAGAAATGTAAC	1620
	<b>K G T G T I A D K N S E C I Q D K N T T T I I C N G R G N</b>	
541	TGCGGAACTGTCACGCTGTGCGGAGAGACAGAAAGGACCAACCACTTCTACACGGGCAGATACTGCGAGTGTGACGATTACAGCTGTCCC	1710
	<b>C G T C T C K R Q K S T T T G R Y C N C D D Y C F</b>	
571	TACTACGCTGGGCTGCTGTGGAGGTCTGGGTCCGGACAGCTGTGCTGTGGAAGCTGTAAAGTGTAAACCGCGTTTCAATGGCAGCAAC	1800
	<b>Y A G L I C G R G R G C G D C G N C K C N A G F N G</b>	
601	TGGGATGTAAACACGACAACTCTACCTGTATGTACAATGGATTGCTGTGTAATGATAAGGAACTTGTGAGTGTGGCAAGTGTACCTGT	1890
	<b>C G C N T D N S T C M Y N G L L C N D K S T C N C G K C T C</b>	
631	ACTGATCTTAAGTACTTTGGACCCAGTGTGACGAAATGTGATACTGTGGCCAGAGCAATGTGCTACCCACAGGACTGTGCGCTGTGT	1980
	<b>T D P K Y F G P Q C Q N C D N C G Q N Q C R T N Q D C A L C</b>	
661	AAACAGAACCAATGCCCGGTACTGACCAAGGAACAGTGTGAAAGAGTGCTCCATACCACCTGCCGTGACAAATCAGAAATGGCATC	2070
	<b>N R T N A G V L T K N Q C N K N C S E T T A V D K I R N G I</b>	
691	ACTAATTTGCGAGTACGTAGACCAAGACGGCTGCTTTATTACTTTACCTATTCTATGACGATGATGGCACACTGAGGGTAGAAGTCCAA	2160
	<b>T N C N Y V D Q N G C F I Y F T Y F Y D D D G T L R V N V Q</b>	
721	AAAGAGCCAGAGTGTCCCGAGGTCAACGTCCCTGCCATGATGCTGGGGGTGATAGCGGGCATCGTGTCTTTGGGATCATCTCCTC	2250
	<b>K N P E C P P N V N V L A I V L G V I A S I V F F G I I L L</b>	
751	CTGATCTGGAACTATTCAACCACTTATGATAGAGAGAGCTGGCCAGGTTTCGAAAAGGAGGCCATGAACGCCCGGATGGGATGGGGA	2340
	<b>L I W K L F T T I S D K R N L A R F N K E A N N A R N D T G</b>	
781	GAAATCTATCTACAACAGGCTACATCCACCTTTGTCAACCCACCTACAGGACGTGAGAACCCCTCTTTTACAGCAGAGGGGGGAAAT	2430
	<b>N N P I Y K Q A T S T F V N P T Y R Q</b> stop	
	cagagcccagaaacgccatggagattataacatgcagctaggcaggga aaaaaaaaaaaaaaaaaa	2496

Fig. 11 cDNA sequence and deduced amino acid translation of *C. gigas*  $\beta_{CGH}$ . The ORF is in the uppercase letters and the 3' and 5' untranslated nucleotides are in the lowercase letters. Nucleotides are numbered on the right from the 5' end (non-bold text) and amino acid residues are numbered on the left in bold text from the initial ATG-encoded methionine. Amino acid residues are marked by characters in bold text. The putative signal peptide beginning at the first Met and ending at the Leu is underlined. The putative ligand binding domain is underlined with a dashed line. The putative transmembrane domain is underlined with a double line. Eight putative N-glycosylation sites are indicated with asterisks (\*). The DDBJ/EMBL/GenBank accession number is AB066348.

次に、相同性解析の結果、 $\beta_{CGH}$  はヒトの  $\beta_1$ 、 $\beta_3$ 、および現在知られている無脊椎動物のインテグリン  $\beta$  鎖に対して、30~47%の相同性を示し、これらの中でマガキに系統発生学上最も近いヒラマキガイの  $\beta_{Bge}$  と最も高い相同性を示した (Table 1)。

以上の結果から、マガキ血球からクローニングした配列は明らかにインテグリン  $\beta$  鎖であることが示された。そして、そのインテグリンはマガキ血球において発現し、受容体として機能していることが推測された。

Table 1 Similarity of human  $\beta_1$  and  $\beta_3$  and 14 known invertebrate  $\beta$  integrins to the *C. gigas*  $\beta_{CGH}$

Similarity (%)		Similarity (%)	
Human <i>H. sapiens</i> $\beta_1$ (Argraves <i>et al.</i> 1987)	41	Mosquito <i>A. gambiae</i> $\beta$ (Mahairaki <i>et al.</i> 2000)	40
Human <i>H. sapiens</i> $\beta_3$ (Fitzgerald <i>et al.</i> 1987)	38	Crayfish <i>P. leniusculus</i> $\beta$ (Holmblad <i>et al.</i> 1996)	37
Sea urchin <i>S. purpuratus</i> $\beta_0$ (Marden and Burke 1996)	39	Snail <i>B. glabrata</i> $\beta_{sp}$ (David <i>et al.</i> 1998)	47
Sea urchin <i>S. purpuratus</i> $\beta_c$ (Marden and Burke 1996)	38	Worm <i>C. elegans</i> $\beta_{int-3}$ (Gettner <i>et al.</i> 1995)	39
Sea urchin <i>S. purpuratus</i> $\beta_t$ (Marden and Burke 1996)	37	Coral <i>A. millepora</i> $\beta_{cal}$ (Brower <i>et al.</i> 1997)	38
Sea urchin <i>L. variegatus</i> $\beta_c$ (Hertler and McClay 1998)	38	Sponge <i>G. cydonium</i> $\beta_{cal}$ (Wimmer <i>et al.</i> 1998)	37
Hy <i>D. melanogaster</i> $\beta_{sp}$ (MacKrell <i>et al.</i> 1988)	44	Sponge <i>O. tenuis</i> $\beta_{cal}$ (Brower <i>et al.</i> 1997)	35
Hy <i>D. melanogaster</i> $\beta_v$ (Yee and Hynes 1993)	30	Sponge <i>S. domuncula</i> $\beta$ (Wimmer <i>et al.</i> 1998)	33

Each value was estimated by the BLAST program.

## 総括

本研究では、マガキ血球が示す防御反応におけるインテグリンの機能に焦点をあて、特に異物に対する接着とそれに引き続く血球の動態について解析した。

最初に、各基質に対するマガキ血球の接着・伸展反応について、形態学的観察に基づく定性的解析と伸展率の算定による定量的解析を行うことによって、接着・伸展反応におけるインテグリンの関与について検討した。その結果、マガキ血球の接着・伸展能はFN基質に対して二価陽イオン依存的に亢進することを明らかにした。

次に、マガキ血球の接着反応においてインテグリンとRGD配列の相互作用が関与するのかを確かめるために、RGDペプチドを用いてマガキ血球のFN基質に対する接着阻害実験を行った。その結果、接着阻害効果が認められたが、同時に、アポトーシスが誘導されることが明らかとなった。また、RGDペプチドを作用させなくても、マガキ血球は血リンパ血漿やFN基質に接着すると、1日後には明確にアポトーシスが誘導されることが明らかとなった。

そしてクローニングの結果から、マガキ血球において遺伝子のレベルでインテグリンが存在することを明らかにした。

以上の結果から、マガキ血球にインテグリン様分子が存在し、インテグリン様分子とリガンドのRGD配列との相互作用によって接着・伸展能が発現することが示唆された。そして接着・伸展能の発現に伴うインテグリン様分子の活性化は、アポトーシス誘導の引き金であることが示唆された。

本研究は、血球が示す接着・伸展能に対して、重要かつ新しい生物学的知見を与えるものである。近年、マガキなどで血球の食食能が個体の生理状態をよく反映することが知られおり、食食能の発現にとって不可欠な要素である接着・伸展能も個体の生理状態を表す一つの指標になると思われる。

## 論文審査結果要旨

脊椎動物にみられる適応免疫が存在しない二枚貝の生体防御機構は、強い貪食能を有する血球がその中心を担っていると考えられる。血球が粒子を貪食するには、血球がその粒子に対して自己か非自己か（すなわち、異物かどうか）を認識することが不可欠である。そのためには、血球は標的粒子と接着することが必須である。しかし、近年に至るまで血球が示す接着の重要性についてはあまり意識されず、現象の観察にとどまっていた。そこで本研究では、血球の接着反応を司る分子と想定されるインテグリンの機能に着目し、生化学・分子生物学的解析を行うことによって、マガキ *Crassostrea gigas* の血球における異物認識機構を明らかにすることを目的とした。さらに、インテグリンによって調節を受けた後の血球の動態についても解析した。

最初に、マガキ血球の示す接着・伸展反応へのインテグリンの関与を確かめるために、マガキ血リンパの血漿やインテグリンのリガンドであり細胞接着活性を有するフィブロネクチン（FN）を固相化して、それぞれの基質に対する血球の伸展能を解析した。その結果、マガキ血球の接着・伸展は、FN の存在下で亢進され、それは二価陽イオン依存的であった。血漿にも FN に類似した効果が認められた。さらに、マガキ血球の2つの細胞亜集団である顆粒球と無顆粒球とでは接着反応に大きな違いがみられ、顆粒球は FN や血漿の非存在下でも高い接着・伸展活性を示すのに対し、無顆粒球はリガンドの存在なしでは接着活性は著しく低下することを明らかにした（第1章）。

インテグリン様分子とリガンドの相互作用が関与することが推測されたマガキ血球の接着反応において、RGD 認識機構が関与するのか検討した。その結果、RGD ペプチドで処理をした血球では伸展能の低下が認められるとともに、生存率も大きく低下した。そして、その細胞死はアポトーシスによることを証明した。すなわち、マガキ血球におけるインテグリン様分子の活性化は、アポトーシス誘導の引き金となることが示された（第2章）。

血球の接着・伸展法の解析を通して、マガキ血球にインテグリンの存在が強く示唆された。そこで、遺伝子のレベルでその存在を証明するために、インテグリン  $\beta$  鎖のクローニングを行った。degeneratePCR, RT-PCR, 5', 3'RACE 法をおこなった結果、最終的にインテグリン  $\beta$  鎖の ORF について全塩基配列を決定した。これは 799 個のアミノ酸をコードする 2400bp の塩基から成り立っていた。また、マガキインテグリン  $\beta$  鎖は、細胞外領域、膜貫通領域、細胞質内領域の3つの領域から成り立っていることを明らかにした（第3章）。

以上のように本研究は、マガキ血球が示す防御反応におけるインテグリンの機能を明らかにすることにより、異物に対する接着とそれに続く血球の動態を明確にすることができた世界的にみてもほとんど例のない水準に達した研究である。特に、RGD ペプチドとインテグリンの相互作用が接着・伸展能の発現を導くだけでなく、血球のアポトーシスを誘導するとの発見は大きな意義をもっている。すなわち、異物に対抗するため活性化した血球は、防御の役割を果たしたのち、アポトーシスによってその生命を終えるという、血球の活性化から終末に至る過程の大きな部分を初めて明らかにしたものである。よって審査委員一同は、本論文の著書が博士（農学）の学位を授与されるに値するものと判定した。